

УДК 635.656:581.19

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПЕКТРОВ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ У ОБРАЗЦОВ ДИКОРАСТУЩЕГО ПОДВИДА ГОРОХА *PISUM SATIVUM* L. SSP *ELATIUS*

Т.Н. СЕЛИХОВА, С.В. БОБКОВ

(Всероссийский научно-исследовательский институт
зернобобовых и крупяных культур)

Изучен полиморфизм компонентов электрофоретических спектров запасных белков у дикорастущего (*elatus*) и культивируемого (*sativum*) подвидов гороха *P. sativum* L. Выявлены полиморфные компоненты. Проведен анализ филогенетических отношений между образцами *elatus* и *sativum*. Установлено четкое распределение образцов по двум кластерам дикорастущего и культивируемого подвидов гороха. Показано, что образцы культивируемого подвида *sativum* образуют монофилетическую группу. Полученные результаты указывают на эволюционную обособленность подвидов *elatus* и *sativum* и, следовательно, перспективность использования образцов *elatus* в селекции гороха в качестве источника новых хозяйственно ценных признаков.

Ключевые слова: горох, *Pisum sativum* L. *elatus*, *sativum*, запасные белки, SDS-PAGE электрофорез, UPMGA.

Род *Pisum* L. состоит из двух видов: *Pisum sativum* L. — горох посевной и *Pisum fulvum* Sibth. et Smitn — горох красно-желтый. Вид *P. sativum* L. представлен культивируемым подвидом *sativum* и пятью дикорастущими подвидами: *elatus* (Bieb.) Schmalh., *syriacum* (Boiss. et Noe) Berger, *abyssinicum* (A. Br.) Berger, *transcaucasicum* Makash., *asiaticum* Govorov [5].

Образцы *P. fulvum* активно вовлекают в программы гибридизации с культивируемым видом гороха *P. sativum* для получения интрогрессивных линий, устойчивых к патогенам и неблагоприятным факторам среды [1]. Интерес к диким подвидам *P. sativum* как источнику хозяйственно ценных признаков менее выражен. Однако представители диких подвидов гороха *P. sativum* также могут служить источником генетического разнообразия, не вовлеченного в селекционный процесс. Поэтому исследование электрофоретических спектров запасных белков у диких подвидов гороха позволит оценить дивергенцию и провести идентификацию биохимических мар-

керов, которые могут служить полезным инструментом в селекции гороха. Изучение изменчивости белков семян с использованием электрофореза в полиакриламидном геле проводили у дикорастущего вида гречихи *Fagopyrum tataricum* [4].

Дикорастущий подвид гороха *elatus* (рис. 1) представлен однолетними растениями. Стебель имеет слабую или интенсивную антоциановую пигментацию. Длина стебля составляет 80-150 см. Стебель характеризуется большой склонностью к ветвлению в нижнем ярусе растения. Венчики цветков имеют интенсивную темно-



Рис. 1. Растения *P. sativum* ssp. *elatus*

красно-пурпурную, а парус — светло-синеvато-лиловую окраску. Цветки от среднего до крупного размера. Бобы до 6-8 см длины, жесткие, с выдающимися жилками, часто с внутренней стороны имеют губчатые выросты. Семена округлые, от мелких до среднемелких размеров, различной окраски [5]. Культивируемый подвид *sativum* включает основное разнообразие форм гороха, возделываемого на продовольственные и кормовые цели. В диком состоянии в настоящее время не встречается. Стебель у растений длиной 20-300 см, простой или фасциированный. Подвид культивируемого гороха характеризуется наличием форм с различными типами листьев. Цветки белые или пигментированные, с варьированием от среднемелких до крупных (2-3,5 см). Семена матовые (блеск очень слабый), различной формы и разнообразной окраски. Масса 1000 семян колеблется от 100 до 400 г.

Известно, что подвид *sativum* выделился в результате доместикиции одного из нескольких типов дикого предка *P. elatus*. Следовательно, дикорастущий подвид *P. sativum* L. ssp. *elatus* отличается большим генетическим разнообразием, в отличие от культивируемого подвида *P. sativum* L. ssp. *sativum*. Репродуктивная изоляция между образцами дикорастущего подвида *elatus* и культивируемого *sativum* в научной литературе представлена примерами нарушения мейоза в результате ядерно-цитоплазматической несовместимости [2].

Цель нашей работы — сравнительный анализ спектров запасных белков семян и изучение полиморфизма белковых компонентов у образцов *elatus*, а также оценка филогенетических отношений между подвидами *elatus* и *sativum*.

Методика исследования

Объектом исследования служили образцы из коллекции ВИР подвида гороха *P. sativum* ssp. *elatus* (K4014, K3115, K2524, K2173, K1851). Анализировали образцы *P. sativum* ssp. *sativum*: сорт Стабил и линии 1096, ПАП, ВИ9402, Рас-тип. Использован стандартный арбитражный метод ISTA для выделения и электрофоретического разделения белков семян двудольных [3]. Экстрагировали и анализировали белки из 50 индивидуальных семян каждого представителя подвида гороха.

Экстракция белков из муки индивидуальных семян проведена в течение 20 ч при температуре 3-4 °С с помощью электродного буфера (Трис, глицин, додецил-

сульфат натрия; pH = 8,3). После центрифугирования 10 мкл экстракта переносили в ячейку планшетки, где смешивали с равным объемом буфера нанесения (додецил-сульфат натрия, Трис-HCl, глицерин, меркаптоэтанол, бромфеноловый синий). Концентрация разделяющего геля 10%, концентрирующего — 5%.

Интенсивность компонентов спектра оценивали следующим образом: 1 — слабая, 2 — интенсивная, 3 — очень интенсивная. Относительную подвижность компонентов анализировали по шкале, основанной на спектре белков сои. В эксперименте использовали маркеры молекулярного веса фирмы «SIGMA» (5-205 кДа).

Для определения уровня дивергенции между образцами использовали данные электрофоретического анализа только по наличию или отсутствию компонентов. Матрицу генетических расстояний рассчитывали по алгоритму Nei & Li (1979) [7]. Кластерный анализ проводили по методу UPMGA на основе матрицы генетических расстояний с использованием компьютерной программы TREECON [8]. В качестве внешней группы был использован сорт сои Ланцетная. Индексы бутстрепа (ИБ) рассчитывали для 100 реплик [6].

Результаты и их обсуждение

При анализе семян исследованных образцов *P. sativum* ssp. *elathis* (K4014, K3115, K2524, K2173, K1851) обнаружено большое число типов спектров, различных по составу и интенсивности окрашивания компонентов.

Образцы (K4014, K3115, K2524, K2173, K1851) имели 52 общих компонента и различались по наличию/отсутствию 14 и интенсивности окрашивания 8-го и 48-го компонентов (таблица). Молекулярная масса компонентов варьировала от 17,5 до 97,4 кДа (рис. 2).

Полиморфные компоненты запасных белков у образцов *P. sativum* ssp. *elatus*

Образец	Компоненты														
	8	20	26	30	31	35	40	41	42	45	46	47	48	49	69
K2524	1	1	3	2	3	3	0	3	3	3	3	1	1	0	3
K1851	3	1	3	2	3	0	3	3	0	3	3	0	3	3	3
K2173	3	1	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3
K3115	3	0	0	2	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0
K4014	3	1	0	0	0	0	3	3	3	3	0	0	0	0	3

В диапазоне 45-65 кДа спектров у образцов K2524 и K1851 имеются очень интенсивные компоненты (26 и 31), отсутствующие в спектрах K2173, K3115 и K4014. У образца K2524 обнаружено 35 компонентов, не встречающихся в других образцах *P. sativum* ssp. *elatus* (таблица). В диапазоне 24-45 кДа обнаружено 47 компонентов, характерных только для образца K2524, и 49 — для K1851.

Анализ филогенетических отношений между образцами *elatus* и *sativum* позволил построить дендрограмму (рис. 3).

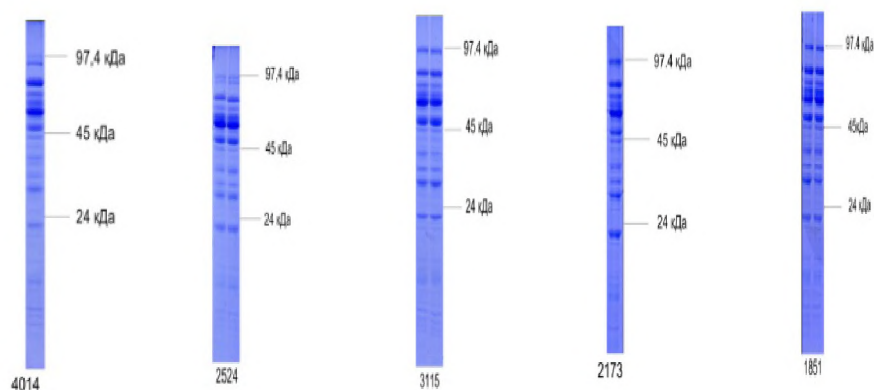


Рис. 2. Электрофоретические спектры белков образцов *P. sativum* ssp. *elatius*

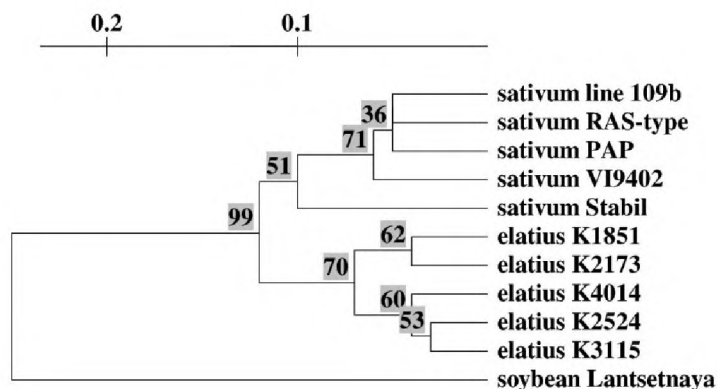


Рис. 3. Дендрограмма филогенетических отношений у образцов подвидов гороха *P. sativum* L. ssp. *elatius* и *sativum*, построенная по методу UPMGA

На дендрограмме с 99%-м значением индекса бутстрепа выделились два кластера. В первый кластер вошли образцы культивируемого подвида гороха *sativum*. Образцы этого кластера образуют кладу. Во второй кластер вошли образцы подвида дикорастущего подвида *elatius*. Образцы *elatius* характеризовались более высоким уровнем дивергенции. Они распределялись по двум обособленным подкластерам (индекс бутстрепа 70%). Первый подкластер формировали образцы K1851 и K2173. Второй — образцы K4014, K2524 и K3 115.

Заключение

В настоящее время образцы дикорастущего подвида гороха *elatius* практически не используются в селекционном процессе в качестве источника хозяйственно ценных признаков. Однако представители диких подвидов гороха *P. sativum* также могут

служить источником генетического разнообразия, не вовлеченного в селекционный процесс. Для оценки перспективности использования диких подвидов в селекции гороха изучен компонентный состав электрофоретических спектров запасных белков у дикорастущего (*elatius*) и культивируемого (*sativum*) подвидов гороха *P. sativum* L. У образцов подвида *elatius* идентифицированы полиморфные белковые компоненты. Проведен анализ филогенетических отношений между образцами *elatius* и *sativum*. Установлено четкое распределение образцов по двум кластерам. Показано, что образцы культивируемого подвида *sativum* образуют монофилетическую группу, что указывает на обеднение генетического базиса современного селекционного материала гороха. Анализ филогенетических отношений выявил обособленность подвидов *elatius* и *sativum* и, следовательно, перспективность использования дикорастущего подвида *elatius* в селекции гороха.

Библиографический список

1. Бобков С.В. Компонентный состав электрофоретических спектров запасных белков межвидовых гибридов гороха / С.В. Бобков, Т.Н. Лазарева // Генетика. 2012. Т. 48. № 1. С. 56-61.
2. Богданова В.С. Нарушения мейоза как проявление ядерно-цитоплазматической несовместимости при скрещивании подвидов посевного гороха / В.С. Богданова, Э.Р. Галиева // Генетика. 2009. Т. 45. № 5. С. 711-716.
3. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / В.Г. Конарев [и др.]; Под ред. В.Г. Конарева. СПб.: ВЙР, 2000. 186 с.
4. Лазарева Т.Н. Изменчивость гречи татарской *F. tataricum* Gaertn. по белкам семян, выявляемая электрофорезом в ПААТ / Т.Н. Лазарева, И.Н. Фесенко и Н.Е. Павловская // Известия ТСХА. 2007. № 3. С. 93-95.
5. Макашева П.Х. Зерновые бобовые культуры / П.Х. Макашева // Культурная флора СССР. СПб.: Колос, 1979. С. 45-49.
6. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap / J. Felsenstein//Evolution. 1985. V. 39. № 4. P. 783-791.
7. Nei M. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // M. Nei, W.H. Li / Mol. Biol. Evol. 1993. V. 10. № 5. P. 1096-1111.
8. Van de Peer Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment / Y. Van de Peer, Y. De Wachter // Comput. Applic. Biosci. 1994. V. 10. P. 569-570.

COMPARATIVE ANALYSIS OF STORAGE PROTEIN SPECTRA IN WILD PEA SUBSPECIES *PISUMSATIVUM* L. SSP. *ELATIUS*

T.N. SELIKHOVA, S.V. BOBKOV

(All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops)

Polymorphism of storage proteins in wild (elatius) and cultivated (sativum) subspecies of pea was studied. Polymorphic bands were identified. Analysis of phylogenetic relationship between samples of elatius and sativum was conducted. It was revealed that samples were divided into two clusters and samples of sativum subspecies formed monophyletic group. As a result phylogenetic

divergence of elatius and sativum subspecies was proved. Consequently, wild elatius subspecies could serve as a prospective source of new valuable properties and alleles which can be used in pea breeding.

Key words: pea, Pisum sativum L., elatius, sativum, storage proteins, SDS-PAGE electrophoresis, UPMGA.

Селихова Татьяна Николаевна — к. б. н., ст. науч. сотр. лаборатории физиологии и биохимии растений ВНИИ зернобобовых и крупяных культур (302502, Орловская область, Орловский район, пос. Стрелецкий, ул. Молодежная, 10, корп. 1; тел.: +74862403460, +79051656660; e-mail: tat.selihowa@yandex.ru).

Бобков Сергей Васильевич — к. с.-х. н., зав. лабораторией физиологии и биохимии растений ВНИИ зернобобовых и крупяных культур (302502, Орловская область. Орловский район, пос. Стрелецкий, ул. Молодежная, 10, корп. 1; тел.: +74862403460, +79051679234; e-mail: svbobkov@gmail.com).

Selikhova Tatyana Nikolaevna — Doctor of Biological Sciences, senior scientist of plant physiology and biochemistry laboratory, All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops (302502, Orlovskaya oblast, Orlovsky district, pos. Streletsky, Molodezhnaya street, 10, building 1; tel.: +74862403460, +79051656660; e-mail: tat.selihowa@yandex.ru).

Bobkov Sergey Vasilievich — Doctor of Agricultural Sciences, head of plant physiology and biochemistry laboratory, All-Russia Research Institute of Legumes and Groat Crops (302502, Orlovskaya oblast, Orlovsky district, pos. Streletsky, Molodezhnaya street, 10, building 1; tel.: +74862403460, +79051679234; e-mail: svbobkov@gmail.com).